

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12N 9/08	AI	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/08272 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. April 1993 (29.04.93)		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/02398 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Oktober 1992 (19.10.92) (30) Prioritätsdaten: P 41 34 716.1 21. Oktober 1991 (21.10.91) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: CALL, Hans-Peter [DE/DE]; Heinsberger Str. 14a, D-5132 Übach-Palenberg (DE). (74) Anwalt: FITZNER, Ulrich; Am Eichförschen 2a, D-4030 Ratingen-Lintorf (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, FI, HU, JP, NO, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE). </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;"> Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> </td> </tr> </table>			(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/02398 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Oktober 1992 (19.10.92) (30) Prioritätsdaten: P 41 34 716.1 21. Oktober 1991 (21.10.91) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: CALL, Hans-Peter [DE/DE]; Heinsberger Str. 14a, D-5132 Übach-Palenberg (DE). (74) Anwalt: FITZNER, Ulrich; Am Eichförschen 2a, D-4030 Ratingen-Lintorf (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, FI, HU, JP, NO, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/02398 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Oktober 1992 (19.10.92) (30) Prioritätsdaten: P 41 34 716.1 21. Oktober 1991 (21.10.91) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: CALL, Hans-Peter [DE/DE]; Heinsberger Str. 14a, D-5132 Übach-Palenberg (DE). (74) Anwalt: FITZNER, Ulrich; Am Eichförschen 2a, D-4030 Ratingen-Lintorf (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, FI, HU, JP, NO, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>			
(54) Title: PROCESS FOR PREPARING LIGNOLYTIC ENZYMES BY MEANS OF WHITE ROT FUNGI (54) Bezeichnung: VEFAHREN ZUR HERSTELLUNG LIGNOLYTISCHER ENZYME MITTELS WEISSFÄULEPILZEN (57) Abstract <p>A process is disclosed for preparing lignolytic enzymes by means of white rot fungi. A culture of fungi belonging to the Aphyllophorales sub-class is introduced into a closed fermentation reactor filled with a nutrient solution, where the suspension is so gently moved, in order to produce pellets of Aphyllophorales, that no shearing forces capable of destroying the pellets can be generated. By adding yeasts or benzaldehydes, chlorobenzaldehydes, nitrobenzaldehydes, hydroxybenzaldehydes, aminobenzaldehydes, methylbenzaldehydes, diaryls, triaryls, dialkylalkanes, trialkylalkanes, open-chained or cyclic imines or derivatives of said substances as inductive compounds, induction being carried out one or several times, enzymes are generated, then harvested.</p>				
(57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung lignolytischer Enzyme mittels Weißfäulepilzen. Hierbei wird eine aus den Pilzen der Unterklasse der Aphyllophorales bestehende Kultur in ein mit Nährlösung gefülltes geschlossenes Fermentationsgefäß gegeben, dort zur Erzeugung von Pellets der Aphyllophorales die Suspension so schonend bewegt, daß keine die Pellets zerstörenden Scherkräfte entstehen können, wobei unter Zusatz von Hefen oder Benzaldehyden, Chlorbenzaldehyden, Nitrobenzaldehyden, Hydroxybenzaldehyden, Aminobenzaldehyden, Methylbenzaldehyden, Diarylen, Triarylen, Dialkylalkanen, Trialkylalkanen, offenkettigen oder cyclischen Iminen oder Derivaten der genannten Stoffe als induktiven Verbindungen, wobei die Induktion einfach oder mehrfach erfolgen kann, die Enzyme erzeugt und danach geerntet werden.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NL	Niederlande
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	PT	Portugal
BR	Brasilien	IE	Irland	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SK	Slowakische Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Sowjet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren zur Herstellung lignolytischer Enzyme
mittels Weißfäulepilzen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung lignolytischer Enzyme mittels Weißfäulepilzen aus der Unterklasse der Aphyllophorales.

In den letzten zehn Jahren ist vielfach versucht worden. Weißfäulepilze im industriellen Maßstab zur Erzeugung lignolytischer Enzyme einzusetzen. Im Mittelpunkt des Interesses stand hierbei *Phanerochaete chrysosporium*.

So gibt es Versuche im Rührfermenter (H.Janshekar und A.Fiechter. Journal of Biotechnology. 8 (1988). 97-112). Diese Versuche waren jedoch wenig erfolgreich. weil im Rührfermenter die von *Phanerochaete chrysosporium* gebildeten Pellets immer wieder zerschlagen werden. Da aber *Phanerochaete chrysosporium* nur dann Enzyme produziert, wenn er in Pelletform oder als Immobilisat vorliegt. läßt sich im Rührfermenter mit den gängigen Verfahren eine optimale Enzymproduktion nicht erreichen.

Darüberhinaus sind in der Bioverfahrenstechnik Reaktoren speziell für empfindliche Zellen entwickelt worden. So ist ein sogenannter Vibromischer entwickelt worden. welcher sich sogar für empfindliche Tier- und Pflanzenzellen eignet (Einsele. Finn. Samhaber: Mikrobiologische und biochemische Verfahrenstechnik. Weinheim 1985. S.150; Einsele: Chem.Eng.Tech. 45 (1973), 1368; Rahm. Chem. Ing. Tech. 42 (1970). 583). Die Wirkung des Vibromixers beruht auf dem Bernoulli-Effekt. Anstelle eines Rührers befindet sich im Innern des Gefäßes eine waagrecht liegende. an einem senkrechten Schaft befindliche Platte. die sich nach unten verengende Bohrun-

gen enthält. Sie wird mit Hilfe des Schafts auf und nieder bewegt. Dabei entstehen Druckdifferenzen in den Bohrungen, weil die Flüssigkeit in den Öffnungen vom großen zum kleinen Durchmesser zurückfließt. Die Zellen werden auf diese Weise zwar gut bewegt, doch bleiben Schädigungen weitgehend aus. Ein derartiger Vibromixer hat jedoch den Nachteil, daß er für die empfindlichen Pellets von *Phanerochaete chrysosporium* immer noch nicht schonend genug arbeitet. Außerdem können derartige Vibromixer bis heute noch nicht im großtechnischen Maßstab eingesetzt werden.

Für die Bildung von Pellets von Mikroorganismen sind schließlich auch Glasgefäße geeignet, welche von Schüttelmaschinen bewegt werden (H.J. Rehm: Einführung in die industrielle Mikrobiologie, Berlin-Heidelberg-New York 1971). Zu diesem Zweck sind die Behältnisse (zumeist Flaschen oder Erlenmeyerkolben) in mehreren Etagen übereinander in die Maschinen eingespannt. Durch die Schüttelbewegung der Gefäße wird Luft von der Oberfläche her in die Lösung eingeschlagen. Zum Schütteln verwendet man Amplituden-, Rotations- und Vibrationsmaschinen, die normalerweise variierbare Bewegungsgeschwindigkeiten haben. Die Gefäße können mit flächigen Ausbuchtungen, den sogenannten Schikanen, versehen sein. Nachteilig bei diesen Systemen ist, daß sie sich nur für den Labormaßstab eignen. Für die großindustrielle Anwendung wären tausende Flaschen bzw. Erlenmeyerkolben notwendig, so daß die Anwendung derartiger Geräte wirtschaftlich nicht sinnvoll ist.

Um die oben genannten Probleme des Einsatzes von Rührreaktoren zu lösen, hat man verstärkt versucht, mit immobilisierten Zellen zu arbeiten (S.Linko, Journal of Biotechnology, 8 (1988), 163-170; H.Willerhausen, A. Jäger, H. Graf, Journal of Biotechnology, 6 (1987), 239-243; Y.Linko, M.Leisola, N.Lindholm, J.Trollier, P.Linko, A.Flechter, Journal of Biotechnology 4 (1986), 283-291). Aber auch diese Versuche scheiterten bei größeren Volumina. In der Regel waren diese Verfahren bei mehr als 40 l Fermentervolumen nicht mehr durchführbar. Der Grund ist im wesentlichen darin zu sehen, daß *Phanerochaete chrysosporium* in Pelletform eine optimale Oberfläche aufweist und daher gerade in diesem Zustand am besten das Enzym produziert.

Um die genannten Probleme bei der Verwendung von *Phanerochaete chrysosporium* für die Produktion von lignolytischen Enzymen zu lösen, ist ein neuartiger Reaktor speziell entwickelt worden. Dieser ist Gegenstand der vorangemeldeten, aber nicht vorveröffentlichten deutschen Patentanmeldung P 40 12 743. Hierbei handelt es sich um ein rührerloses, geschlossenes Fermentationsgefäß, welches in einer kardanischen Aufhängevorrichtung frei drehbar aufgehängt ist. Unter dem Gefäß ist ein Antriebsmotor angeordnet, dessen Antriebswelle mit dem Boden des Gefäßes mit einem Exzenter verbunden ist. Durch den Exzenter lassen sich Neigungswinkel und Schwingungsamplitude des Gefäßes einstellen. Mittels des stufenlos regelbaren Motors können somit Dreh- und Schwenkbewegungen des Gefäßes erreicht werden.

In dem auf diese Art bewegten Fermenter bildet *Phanerochaete chrysosporium* Pellets, ohne daß diese durch mechanische Einflüsse fortwährend wieder zerstört werden. Dies hat zur Folge, daß die Pellets eine für die Enzymproduktion optimale Form erreicht. Da andererseits die schwingungsarme kardanische Aufhängung des Reaktors auch den Bau von Reaktorvolumina zwischen ein und drei Kubikmeter gestattet, läßt sich mit der beschriebenen Vorrichtung eine Produktion lignolytischer Enzyme im industriellen Maßstab mit bis dahin nicht für möglich gehaltenen Ausbeuten erreichen.

Die Ergebnisse der Produktion mit diesem Fermenter sind jedoch immer noch nicht zufriedenstellend. Denn die Ausbeuten haben hierbei immer noch nicht ein solches Volumen erreicht, daß sie für eine großindustrielle Produktion lohnend wären.

Die vorliegende Erfindung hat sich daher die Aufgabe gestellt, ein verbessertes Verfahren zur Herstellung lignolytischer Enzyme mittels Weißfäulepilzen, wobei eine aus Pilzen der Unterklasse der Aphyllophorales bestehende Kultur in ein mit Nährlösung gefülltes, geschlossenes Fermentationsgefäß gegeben wird, dort zur Erzeugung von Pellets der Aphyllophorales die Suspension so schonend bewegt wird, daß keine die Pellets zerstörenden Scherkräfte entstehen können, zur Verfügung zu stellen, das auch in Fermentationsgefäßen von mehr als 40 l durchführbar ist und gegenüber dem bisherigen Stand der Technik signifikant gesteigerte Enzymausbeuten gewährleistet.

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß unter Zusatz von Hefen oder Benzaldehyden, Chlorbenzaldehyden, Nitrobenzaldehyden, Hydroxybenzaldehyden, Aminobenzaldehyden, Methylbenzaldehyden, Diarylen oder Triarylen, Dialkylalkanen, Trialkylalkanen, offenkettigen oder cyclischen Iminen oder Derivaten der genannten Stoffe als induktiven Verbindungen, wobei die Induktion einfach oder mehrfach erfolgen kann, die Enzyme erzeugt und danach geerntet werden.

Durch den Einsatz einer aus Aphyllophorales und Hefen bestehenden Mischkultur wird eine erhebliche Steigerung der Enzymproduktion im Vergleich zum bisherigen Stand der Technik erreicht. Die der Kultur zugesetzten Hefen werden hierbei im Laufe des Verfahrens von den Aphyllophorales fast vollständig lysiert. Die erheblichen Mengen an freiwerdenden Hefebestandteilen, z.B. Zellwandbestandteile und Hefeglukane, haben wahrscheinlich Schutzkolloidcharakter und bewirken so eine Steigerung der Enzymproduktion.

Es ist aus dem Stand der Technik bekannt, daß verschiedene chemische Substanzen als Induktoren in Fermentationslösungen wirken können. So lassen sich die Laccaseausbeuten z.B. durch Zusatz von Xylidin verbessern. Diese und ähnliche Substanzen sind aber wegen ihrer hohen Toxizität großtechnisch kaum einsetzbar, so daß man von dieser Möglichkeit einer Enzymsteigerung bisher keinen Gebrauch gemacht hat. Erfindungsgemäß wurde nun eine neue Induktorengruppe gefunden, die diese Nachteile nicht aufweist. Es handelt sich hierbei Benzaldehyde, Chlorbenzaldehyde, Nitrobenzaldehyde, Hydroxybenzaldehyde, Aminobenzaldehyde, Methylbenzaldehyde, Diaryle, Triaryle, Dialkylalkane, Trialkylalkane, offenkettige oder cyclische Imine. Ebenso können die Derivate der genannten Verbindungen verwendet werden. Diese Stoffe weisen überraschenderweise nicht die genannten Nachteile auf. Insbesondere sind sie aber auch für den Einsatz im großtechnischen Maßstab geeignet. Überraschend ist insbesondere, daß sich durch den Einsatz der genannten Induktoren sehr hohe Enzymausbeuten erreichen lassen (ca. 2000 IU/ml Enzym).

Die geschilderten überraschend verbesserten Enzymausbeuten können bereits bei Einsatz der Gemische aus Aphyllophorales mit Hefen oder den aufgezählten Induktoren in herkömmlichen Rührfermentern beobachtet werden. Diese müssen allerdings mit einem speziellen Rührer

ausgestattet sein, dessen Paddel sich verstellen lassen, daß beim Rühren kaum Scherkräfte entstehen, welche zu einer Zerstörung der gebildeten Pellets führen können. Erfindungsgemäß wichtig ist daher zum einen die Gestalt des Rührers und zum anderen die Möglichkeit des Verstellens der Paddel.

Besonders gut sind jedoch die Enzymausbeuten, wenn der oben beschriebene Reaktor gemäß der Deutschen Patentanmeldung P 40 12743 eingesetzt wird. Denn die bei Einsatz dieses Fermenters bereits signifikant erhöhten Enzymausbeuten lassen sich in überraschender Weise nochmals steigern durch Einsatz eines Gemisches aus Apyllophorales und Hefen oder den speziellen induktiv wirkenden Verbindungen, wobei die Induktion einfach oder mehrfach erfolgen kann.

In einer Variante des Verfahrens kann hierbei so vorgegangen werden, daß zunächst in dem Schüttelfermenter die Pellets unter Zugabe von Hefe oder Benzaldehyden erzeugt werden und im Anschluß hieran die Pellets enthaltende Suspension in einen Rührfermenter überführt wird. Hier werden dann die Enzyme mittels der Pellets produziert. Als vorteilhaft ist weiterhin anzusehen, daß nach Abschluß der Enzymproduktion im Schüttelfermenter oder im Rührfermenter sich die abgetrennten Pellets der Aphylophorales unmittelbar wieder für die Enzymproduktion einsetzen lassen. Zweckmäßigerweise trennt man hierfür die Pellets von der restlichen Suspension ab und führt sie nach Abtrennung des Enzyms in den Fermenter zurück. Die Abtrennung kann erfindungsgemäß mittels Ultrafiltration durchgeführt werden. In einer erfindungsgemäß bevorzugten Ausführungsform wird *Phanerochaete chrysosporium* im Gemisch mit Hefen eingesetzt. Hierbei können beim Einsatz im Rührfermenter Spitzenwerte von ca. 1000 IU/pro l Kultur erreicht werden. Beim Einsatz im Schüttelfermenter liegen diese Werte bei 1500 - 2000 IU/l (1 IU = Umsatz pro 1 micromol Veratrylaalkohol/min./ml Enzym in Veratrylaldehyd).

Vor Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann *Phanerochaete chrysosporium* zweckmäßigerweise in Petrischalen und dann in Standkulturen angezüchtet werden. Die gebildeten Mycele werden im Anschluß hieran zerschlagen und in dem erfindungsgemäßen

Verfahren eingesetzt. Die Anzucht von *Phanerochaete chrysosporium* erfolgt unter bekannten Bedingungen. D.h. es wird üblicherweise bei Temperaturen von 37 - 40 ° C und einem pH Wert von 4.5 bis 5 gearbeitet. Der bevorzugte pH Wert liegt bei 5. Als Anzuchttemperatur werden 37 ° C bevorzugt.

Als Substrat für die Kultur von *Phanerochaete chrysosporium* im Gemisch mit Hefen hat sich die folgende Zusammensetzung bewährt:

Vorkulturmedium:

1) Mineralsalzlösung (ME): (pro Liter)

10.5 g Nitrotriacetat; 21 g $MgSO_4$; 3.5 g $MnSO_4$; 7 g NaCl; 0.7 g $FeSO_4$;
0.7 g $CoCl_2$; 0.7 g $CaCl_2$; 0.7 g $ZnSO_4$; 0.07 g $CuSO_4$; 0.07 g $CuSO_4$;
0.07 g AlK_2SO_4 ; 0.07 g H_3BO_3 ; 0.07 g $NaMoO_4$.

2) Lösung 1 (Salzlösung) (pro Liter)

20 g KH_2PO_4 ; 5 g $MgSO_4$; 1 g $CaCl_2$.

3) Puffer (pH 4.5-5.5)

1 m NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 - Puffer.

Zusammensetzung pro 1 l Medium:

0.2 g Ammoniumtartrat
100 ml Lösung 1
1.43 ml ME-Lösung
10 g Glukose
10 ml Puffer
+0.9 ml Thiamin 100 mg/l (wird nach dem Autoklavieren steril-
filtriert zugesetzt).

Hauptkulturmedium:**Zusammensetzung pro 1 Medium:**

0.2 g Ammoniumtartrat
100 ml Lösung 1
10 ml ME-Lösung
10 g Glukose
10 ml Puffer
67.3 mg Veratrylalkohol
2 ml Tween 80
+0,9 ml Thiamin (100 mg/l).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird *Coriolus versicolor* in Kombination mit den oben aufgezählten Induktoren insbesondere Benzaldehyden oder deren Derivaten eingesetzt. Es ist aus dem Stand der Technik bekannt, daß sich gute Laccaseausbeuten mit Induktoren, z.B. Xylidin erreichen lassen. Doch aus den oben genannten Gründen haben sich diese Induktoren nicht bewährt. Durch Einsatz dererfindungsgemäßen Induktoren in Kombination mit *Coriolus versicolor* konnten nunmehr in überraschenderweise Steigerungen der Enzymausbeuten bis zu 100% erreicht werden. Im folgenden wird die Erfindung unter Bezugnahme auf die Figuren näher beschrieben:

Figur 1 zeigt den erfindungsgemäß eingesetzten rührerlosen Fermenter.

Figur 2a zeigt die spezielle Ausgestaltung eines Rührers für den Einsatz in dem erfindungsgemäßen Verfahren in der Ansicht von oben.

Figur 2b zeigt den Rührer in der Quersicht.

Figur 2c zeigt den Rührer in der Ansicht von der Seite.

In dem in Figur 1 dargestellten rührerlosen Reaktor erfolgt in erster Linie die Herstellung der Pellets der Aphyllophorales und gegebenenfalls die Herstellung der Enzyme. Hierbei erfolgt die Bildung der Pellets in dem Gefäß 1. Das Gefäß 1 ist ein geschlossener Behälter mit festem Boden 8, Seitenwänden, Deckel 9 und einer Sichtscheibe 7. Seitlich oder am Boden sind Öffnungen für diverse Meßfühler (O_2 , PH, Antischaum) sowie für Zu- und Ablauf von Substrat und Impfkultur vorgesehen. Es ist in einem Gestell 11 aufgehängt. Die Befestigung erfolgt hierbei mittels der Greifarme 10. Über diese Greifarme 10 ist das Gefäß 1 an der kardanischen Aufhängevorrichtung frei dreh- und schwenkbar aufgehängt. Die Dreh- und Schwenkbewegungen werden durch den Motor 6 bewirkt. Dieser ist über die Antriebswelle 5 und den Exzenter 4 mit dem Boden 8 des Gefäßes 1 verbunden. Mittels des Exzenters 4 werden Neigung und Schwingamplitude des Gefäßes 1 eingestellt. Die Geschwindigkeit der Dreh- und Schwenkbewegungen des Gefäßes 1 läßt sich über die Motordrehzahl regeln.

Der in den Figuren 2a-2c dargestellte Rührer ist den beiden Paddeln 1 und 2 ausgestattet. Deren Neigungswinkel läßt sich mit Hilfe der Verstellerschraube 3 verändern. Auf diese Weise läßt sich der Rührer jeweils exakt entsprechend der Empfindlichkeit der eingesetzten Zellen einstellen, so daß keine die Pellets zerstörenden Scherkräfte auftreten können.

Die Erfindung wird weiterhin anhand folgender Beispiele erläutert:

Beispiel 1:

Als Stamm wird *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 32629 genommen. Zunächst werden Malzagarplatten beimpft und ca. 10-12 Tage bei 27° C bebrütet. Von diesen Platten wird die Hälfte des Rasens abgenommen und eine 50 ml Standkultur in 500 ml Erlenmeyerkolben beimpft (Bebrütungszeit ca. 5 Tage bei 37° C). Die so erhaltene Vorkultur wird abdekantiert, wieder auf das ursprüngliche Volumen mit a.dest. aufgefüllt und daraufhin in einem Braun Starmix für 2 x 30 Sec. auf Stufe 3

zerkleinert. Pro Liter Medium im Schüttelreaktor werden 15 ml Vorkultur zugegeben. d.h., auf einen 10 l Schüttelreaktor mit 5 l Befüllung 75 ml. An Hefen werden $0.5-0.8 \times 2-4 \times 10^5$ Hefen/ml Medium zugegeben. Die Anzuchttemperatur beträgt 38°C , die Schüttelfrequenz 90 rpm und die Auslenkung ca. 5cm. Es wird jeden Tag für 30 Sec. mit O_2 (100 l pro Std.) begast. Die Anzuchtdauer beträgt 4-5 Tage. Die Enzymausbeuten betragen ca. 1500-2000 IU / l (1IU = 1 μ Mol Umsatz von Veratrylalkohol in Veratryldehyd/Min.).

Die Medien sind wie folgt zusammengesetzt:

Vorkulturmedium:

1) Mineralsalzlösung (ME): (pro Liter)

10.5 g Nitrotriacetat; 21 g MgSO_4 ; 3.5 g MnSO_4 ; 7 g NaCl; 0.7 g FeSO_4 ; 0.7 g CoCl_2 ; 0.7 g CaCl_2 ; 0.7 g ZnSO_4 ; 0.07 g CuSO_4 ; 0.07 g CuSO_4 ; 0.07 g AlK_2SO_4 ; 0.07 g H_3BO_3 ; 0.07 g NaMoO_4

2) Lösung 1 (Salzlösung) (pro Liter)

20 g KH_2PO_4 ; 5 g MgSO_4 ; 1 g CaCl_2 .

3) Puffer (pH 4.5-5.5)

1 m NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 - Puffer.

Zusammensetzung pro 1 l Medium:

0.2 g Ammoniumtartrat
100 ml Lösung 1
1.43 ml ME-Lösung
10 g Glukose
10 ml Puffer
+0.9 ml Thiamin 100 mg/l (wird nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugesetzt).

Hauptkulturmedium:**Zusammensetzung pro 1 Medium:**

0,2 g Ammoniumtartrat
100 ml Lösung 1
10 ml ME-Lösung
10 g Glukose
10 ml Puffer
67,3 mg Veratrylalkohol
2 ml Tween 80
+0,9 ml Thiamin (100 mg/l).

Beispiel 2:

Als Stamm wird *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 32629 genommen. Zunächst werden Malzagarplatten beimpft und ca. 10-12 Tage bei 27 ° C bebrütet. Von diesen Platten wird die Hälfte des Rasens abgenommen und eine 50 ml Standkultur in 500 ml Erlenmeyerkolben beimpft (Bebrütungszeit ca. 5 Tage bei 37 ° C). Die so erhaltene Vorkultur wird abdekantiert, wieder auf das ursprüngliche Volumen mit a.dest. aufgefüllt und daraufhin in einem Braun Starmix für 2 x 30 Sec. auf Stufe 3 zerkleinert. Pro Liter Medium im Rührreaktor werden 15 ml Vorkultur zugegeben, d.h., auf einen 10 l Schüttelreaktor mit 5 l Befüllung 75 ml. Als Hefe werden $2-4 \times 10^5$ Hefen/ml Medium zugegeben. Die Anzuchttemperatur beträgt 38 ° C, die Rührerdrehzahl 110 rpm.

Der Sauerstoff Partialdruck der Kultur wird mit Hilfe einer O₂-Messung mittels O₂-Elektrode und Steuerung auf 30-70 % gehalten. Die Anzuchtdauer beträgt 4-5 Tage. Die Enzymausbeuten betragen bis 1000 IU/l.

Beispiel 3:

Als Stamm wird der Stamm *Coriolus versicolor* ATCC 34671 verwendet. Von Malzschrägagarröhrchen wird mit Hilfe eines Korkbohrers ein ca. 1 cm \varnothing großes Mycelagarstück auf die Mitte einer Malzagarplatte gebracht und ca. 8 Tage bebrütet (28° C). Von dieser Platte werden je drei 1 cm \varnothing Stücke ausgestanzt und mit der Mycelseite nach oben auf eine 50 ml Standkultur (im 300 ml Erlenmeyerkolben) gebracht. Bebrütung ca. 8 Tage bei 28° C. Der gebildete Mycelrasen wird von der Standkulturflüssigkeit getrennt und für 2 x 30 Sec. in einem Braun Starmix gemixt (Stufe 3).

Pro 1 Medium werden 30-60 ml Vorkulturmedium als Inokulum verwendet. Als Induktor wird nach 3-4 Tagen Anzuchtzeit 10-20 ml einer 1 %-igen Lösung von 2-Aminobenzaldehyd in 50 %-igen Alkohol verwendet. Die gesamte Anzuchtzeit beträgt 6 Tage.

Als Medium kommt die im folgenden wiedergegebene Zusammensetzung in Betracht:

A. Lösungen:

Lösung 1:

10 g KH_2PO_4
5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
in 1000 ml A.dest. lösen

Mineral-Lösung:

1 g CaCl_2
1 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
0.2 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
0.1 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
0.1 g $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
in 1000 ml A.dest. lösen

Thiamin-Lösung:

100 mg Thiamin x HCl
in 1000 ml A.dest. lösen

- Adenin-Lösung: 0.275 g Adenin
in 1000 ml A.dest. lösen
- Phenylalanin-Lösung: 1.5 g D,L-Phenylalanin
in 1000 ml A.dest. lösen
- Induktor-Lösung: 1 g 2-Aminobenzaldehyd
in 100 ml 50 %-igen Ethanol lösen
- B. Medien:
- Vorkultur-Medium: 20 g Glucose
2.5 g L-Asparagin
100 ml Lösung
10 ml Mineral-Lösung
100 ml Adenin-Lösung
100 ml Phenylalanin-Lösung
mit A.dest. auf 1000 ml auffüllen.
den pH-Wert mit 1 M HCl auf pH 5.0
einstellen.
- 0.5 ml Thiamin-Lösung
nach dem Autoklavieren sterilfiltriert
zugeben.
- Hauptkultur-Medium: entspricht dem Vorkultur-Medium mit
folgendem Zusatz auf 1000 ml:
- 10-20 ml einer 1 %-igen Lösung von
z.B. 2-Aminobenzaldehyd in 50 %-igen
Äthanol.

A n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Herstellung lignolytischer Enzyme mittels Weißfäulepilzen, wobei eine aus Pilzen der Unterklasse der Aphyllophorales bestehende Kultur in ein mit Nährlösung gefülltes, geschlossenes Fermentationsgefäß gegeben wird, dort zur Erzeugung von Pellets der Aphyllophorales die Suspension so schonend bewegt wird, daß keine die Pellets zerstörenden Scherkräfte entstehen können, dadurch gekennzeichnet, daß unter Zusatz von Hefen oder Benzaldehyden, Chlorbenzaldehyden, Nitrobenzaldehyden, Hydroxybenzaldehyden, Aminobenzaldehyden, Methylbenzaldehyden, Diarylen, Triarylen, Alkylalkanen, Trialkylalkanen, offenkettigen oder cyclischen Iminen oder Derivaten der genannten Stoffe als induktiven Verbindungen, wobei die Induktion einfach oder mehrfach erfolgen kann, die Enzyme erzeugt und danach geerntet werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß nach Abschluß der Enzymproduktion die Pellets von dem flüssigen Nährmedium abgetrennt und erneut zur Enzymproduktion in den Fermenter zurückgeführt werden.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Kultur in einen Fermenter gegeben wird, welcher mit einem Rührer ausgestattet ist, dessen Paddel so einstellbar sind, daß keine die Pellets zerstörenden Scherkräfte entstehen.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß Phanerochaete chrysosporium unter Zusatz von Hefen in das Fermentationsgefäß gegeben wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, daß
Coriolus versicolor unter Zusatz von Benzaldehyden, Chlorbenzaldehy-
den, Nitrobenzaldehyden, Hydroxybenzaldehyden, Aminobenzaldehy-
den, Methylbenzaldehyden, Diarylen, Triarylen, Dialkylalkanen,
Trialkylalkanen, offenkettigen oder cyclischen Iminen oder Derivaten
der genannten Stoffe als induktiven Verbindungen, wobei die
Induktion einfach oder mehrfach erfolgen kann, die Enzyme
erzeugt.

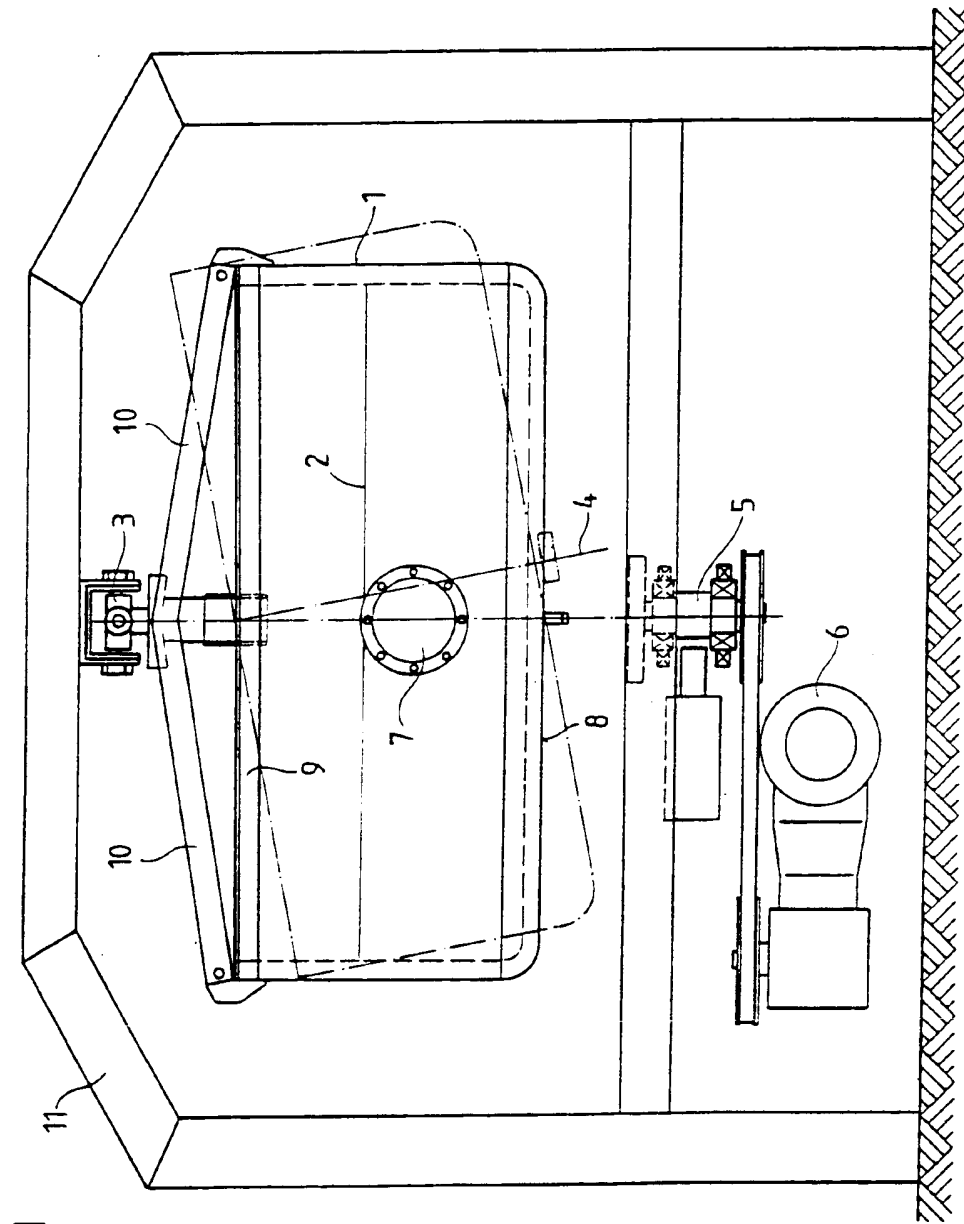


Fig.1

Fig.2a

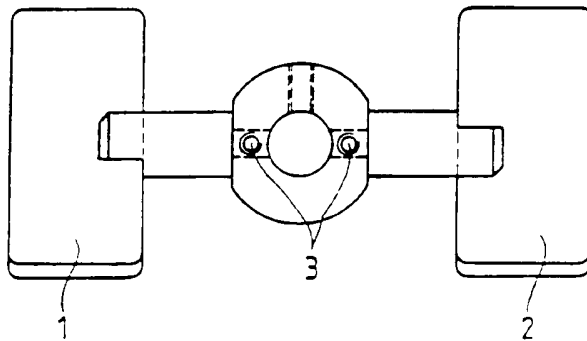


Fig.2b

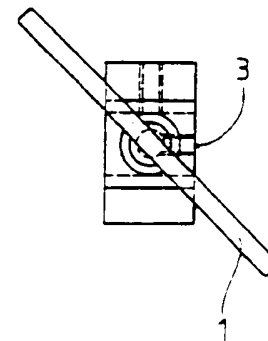
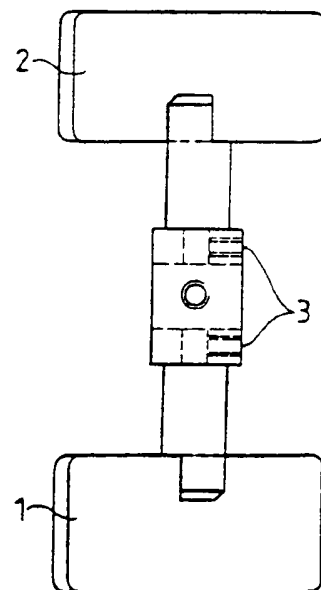


Fig.2c



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 92/02398

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁵ C12N9/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁵ C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, A, 9 004 021 (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE) 19 April 1990 see page 4, line 5 - page 5, line 20 ---	1,4
A	FR, A, 2 600 077 (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE) 18 December 1987 ---	
A	JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. Vol. 8, No.2, June 1988, AMSTERDAM NL pages 163 - 170 S. LINKO 'Continuous production of lignin peroxidase by immobilized Phanerochaete chrysosporium in a pilot scale bioreactor' ---	
	--- -/--	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 February 1993 (18.02.93)

Date of mailing of the international search report

9 March 1993 (09.03.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/02398

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 109, No. 13, 26 September 1988, Columbus, Ohio, US; abstract No. 108861, M. ASTHER ET AL 'Strategies to enhanced ligninase production by Phanerochaete chrysosporium' page 484; & FEMS SYMP. Vol. 43, 1988, pages 333 - 347 see the whole document	
A	----- JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. Vol. 8, No. 2, June 1988, AMSTERDAM NL pages 97 - 112 H. JANSHEKAR AND A. FIECHTER 'Cultivation of Phanerochaete chrysosporium and production of lignin peroxidases in submerged stirred tank reactors' -----	

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9202398
SA 66459

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for those particulars which are merely given for the purpose of information. 18/02/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9004021	19-04-90	FR-A- 2637292	06-04-90
		EP-A- 0437500	24-07-91
		US-A- 5153121	06-10-92

FR-A-2600077	18-12-87	None	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 92/02398

I. KLASSEFIZIKATION DES ANMELDUNGS-GEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Kl. 5 C12N/08		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	C12N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ¹⁰	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
A	WO,A,9 004 021 (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE) 19. April 1990 siehe Seite 4, Zeile 5 - Seite 5, Zeile 20 ---	1,4
A	FR,A,2 600 077 (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE) 18. Dezember 1987 ---	
A	JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. Bd. 8, Nr. 2, Juni 1988, AMSTERDAM NL Seiten 163 - 170 S. LINKO 'Continuous production of lignin peroxidase by immobilized Phanerochaete chrysosporium in a pilot scale bioreactor' ---	
-/-		
<p>¹⁰ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" Älteres Dokument, das jedoch erst vor oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Besetzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Abschlußdatum des internationalen Recherchenberichts	
18.FEBRUAR 1993	09.03.93	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
EUROPAISCHES PATENTAMT	VAN DER SCHAAL C.A.	

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 109, no. 13, 26. September 1988, Columbus, Ohio, US; abstract no. 108861, M. ASTHER ET AL 'Strategies to enhanced ligninase production by Phanerochaete chrysosporium' Seite 484 ; & FEMS SYMP. Bd. 43, 1988, Seiten 333 - 347 siehe das ganze Dokument ---</p>	
A	<p>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. Bd. 8, Nr. 2, Juni 1988, AMSTERDAM NL Seiten 97 - 112 H. JANSHEKAR AND A. FIECHTER 'Cultivation of Phanerochaete chrysosporium and production of lignin peroxidases in submerged stirred tank reactors' -----</p>	

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9202398
SA 66459

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

18/02/93

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9004021	19-04-90	FR-A- 2637292	06-04-90
		EP-A- 0437500	24-07-91
		US-A- 5153121	06-10-92

FR-A-2600077	18-12-87	Keine	

EPO FORM P0073

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/92